Aus dem
Fachbereich Medizin
der Schering AG Berlin
(Direktor: Prof. Dr. med. G. Laudahn)

Vergleichende Untersuchungen mit einer neuen Färbemethode zur morphologischen Differenzierung von Spermatozoen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Constantin Ammann
aus Berlin

1906

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549614_0008

Aus dem
Fachbereich Medizin
der Schering AG Berlin
(Direktor: Prof.Dr.med.G.Laudahn)

Vergleichende Untersuchungen mit einer neuen Färbemethode zur morphologischen Differenzierung von Spermatozoen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Constantin Ammann
aus Berlin

Referent: Prof.Dr.med.G.Laudahn

Korreferent: Prof.Dr.med.R.Gossrau

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am : 7.3.1986

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	5
1.	Anforderungen an Färbemethoden	5
2.	Fragestellung	7
II.	Material, Methoden und Versuchspläne	8
1.	Untersuchungsmaterial	8
2.	Färbevorschriften und erforderliche Lösungen	8
2.1.	Nativpräparate	8
2.2.	Ausstrichspräparate	9
3.	Technik der morphologischen Differenzierung	11
4.	Durchführung der Versuche	13
4.1.	Vorversuche	13
4.2.	Hauptversuch	15
5.	Statistische Verfahren	16
III.	Ergebnisse	18
1.	Vorversuche	18
1.1.	Ergebnisse der Vorversuche	18
1.2.	Konsequenzen der Vorversuche	23
2.	Hauptversuch	25
2.1.	Vergleich der Nativpräparate	25
2.1.1.	Qualitative Beschreibung	25
2.1.2.	Häufigkeiten pathologischer Formen	27
2.1.3.	Einfluß des Differenzierungszeitpunktes	30
2.2.	Vergleich der Ausstrichspräparate	35
2.2.1.	Qualitative Beschreibung	35
2.2.2.	Häufigkeiten pathologischer Formen	37
2.2.3.	Reproduzierbarkeit, Variabilität und Haltbarkeit	40
2.3.	Vergleich aller Präparate - Einfluß der Fixierung	45

		Seite
IV.	Diskussion	47
1.	Färbemethoden	47
2.	Vorversuche und Methodenkritik	49
3.	Hauptversuch	52
V.	Zusammenfassung	55
VI.	Literatur	56

I. Einleitung

1. Anforderungen an Färbemethoden

Die morphologische Beurteilung des Ejakulats ist wesentlicher Bestandteil der andrologischen Diagnostik in Klinik und Praxis (Schirren - 1983). Das Auftreten und die Häufigkeit gewisser pathologischer Spermienveränderungen, von Zellen der Spermatogenese und des weißen Blutbildes, sowie von Mikroorganismen können Rückschlüsse auf zugrundeliegende Erkrankungen und Ursachen einer Infertilität erlauben (Zanefeld und Polaski - 1977). Da jeder Mann durch sein für ihn spezifisches Spermiogramm charakterisiert (Hartman et al. - 1964), und die Zytologie der Samenflüssigkeit ein sensitiver Indikator für das Einwirken diverser Noxen auf das Keimepithel ist (MacLeod - 1964), stellt die morphologische Beurteilung des Ejakulats ein empfindliches Hilfsmittel für den Pharmakologen und den Mediziner bei der frühzeitigen Erfassung möglicher antiandrogener Eigenschaften neuer Arzneimittel dar (Hefter - 1974; MacLeod - 1965).

Die Lokalisation pathologischer Veränderungen an Spermien kann auch weiterhin Rückschlüsse darüber zulassen, ob es sich um vitale oder postvitale Veränderungen der Spermien handelt, oder in welcher Phase der Spermiogenese die Noxe wirkte (Fredricsson - 1978). Eine genaue lichtmikroskopische Beurteilung der Spermienmorphologie sowie weiterer zellulärer Bestandteile des Ejakulats ist nur mit Hilfe angefärbter Präparate möglich (Schirren - 1982). Dies gilt sowohl für Nativpräparate als auch für luftgetrocknete und fixierte Ausstrichspräparate.

Aus der Vielzahl der in der Geschichte der Lichtmikroskopie vorgeschlagenen Färbemethoden haben sich einige wenige für den Routinebetrieb durchsetzen können.

Als häufig benutztes aufwendiges Routineverfahren für Ausstrichspräparate findet man in Kliniklaboratorien die Färbung nach Papanicolaou (Papanicolaou - 1942), beziehungsweise die Hämatoxylin-Eosin Färbung, die auch als Mayer-Stiasny Färbung bezeichnet wird (Schirren 1982).

Für den Praxisalltag wurden in den letzten Jahren vorgefertigte Schnelltests für Nativpräparate, wie die vorgefertigten Testsimplets von Boehringer/Mannheim und die Färbefolien Sandodiff von Merck entwickelt (Schirren et al. - 1977; Wernicke und Schirren - 1982).
Anforderungen an Färbemethoden beziehen sich zum einen auf das Färbeverhalten (Tabelle 1a), zum anderen auf die Praktikabilität (Tabelle 1b).

Tab.:1
Anforderungen an Färbemethoden zur morphologischen Differenzierung von Spermiogrammen

a) Gute Erkennbarkeit einzelner Strukturen der Spermien
Gute Differenzierbarkeit von Rundzellen
Wenig Artefakte
Gute Reproduzierbarkeit

b) Unkompliziertheit der Methode
Schnelligkeit der Durchführung
Haltbarkeit des Präparates

Die Gewichtung der einzelnen Eigenschaften hängt vom Ort und Zweck der Untersuchung ab. Für den Wissenschaftler mit Speziallabor werden die unter a) aufgeführten Eigenschaften von Vorrang sein; wohingegen für den praktisch tätigen Arzt höchst differenzierte Aufschlüsselungen der pathologischen Spermien sowie der Jungformen, wie sie zum Beispiel von Moench (1931), MacLeod und Gold (1951) und Joel (1953) empfohlen wurden, wenig klinische Relevanz besitzen und die unter b) genannten Eigenschaften an Bedeutung gewinnen. Bei der Suche nach einer einfachen, schnellen und doch guten Färbemethode fiel die Sternheimer-Malbin Färbung positiv auf.
Bei der Sternheimer-Malbin Färbung handelt es sich um eine Mischung aus Gentianaviolett und Safranin (siehe II.2.). Sie wurde

lange Zeit in der Urologie als Spezialfärbung eingesetzt, um Degenerationsformen von Leukozyten - sogenannte Sternheimer-Malbin Zellen, die als pathognomonisch für chronische Pyelonephritiden beschrieben sind (Sternheimer und Malbin - 1951), nachzuweisen. Die Möglichkeit des Einsatzes der Sternheimer-Malbin Färbung für Nativpräparate von Ejakulaten wurde zwar in einer Kurzmitteilung (Alford und Rivard - 1981) erwähnt, ist jedoch nie systematisch und vergleichend zu Standardfärbemethoden untersucht worden. Folglich sind ihr Wert und ihre Einsatzmöglichkeit bislang nicht ausreichend beurteilbar.

2. Fragestellung

Im folgenden wird die Frage untersucht, inwieweit die Sternheimer-Malbin Färbung für die lichtmikroskopische Analyse von Ejakulaten, insbesondere zur Beurteilung der Spermienmorphologie, geeignet und auch im Routinebetrieb in kleineren Laboratorien einsetzbar ist.
Die Färbung wird im direkten Vergleich zu häufig verwendeten Standardmethoden - den industriell vorgefertigten Testsimplets für Nativpräparate und der Färbung nach Papanicolaou für Ausstrichspräparate - geprüft und entsprechend den oben genannten Anforderungen (Tabelle 1) bewertet.

II. Material, Methoden und Versuchspläne

1. Untersuchungsmaterial

Es wurden insgesamt 274 Präparate von 72 durch Masturbation gewonnenen Ejakulaten morphologisch differenziert. Diese Ejakulate stammen von 6 gesunden Probanden im Alter von 20 - 28 Jahren, die, unabhängig von dieser Untersuchung, im Rahmen eines Ganzkörperokklusionsversuches mit dem antiandrogenen Wirkstoff 17-propyltestosteron behandelt wurden (Wendt et al. interner Forschungsbericht Schering AG).
Um das Färbeverhalten sowohl bei normalen als auch bei pathologischen Spermiogrammen untersuchen zu können, wurden Ejakulate zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Behandlung mit dem Wirkstoff gewonnen.

2. Färbevorschriften und erforderliche Lösungen

2.1. Nativpräparate

Sternheimer-Malbin Färbung

Färbevorschrift:	100 µl verflüssigtes Ejakulat werden mit 20 µl Sternheimer-Malbin Färbelösung vorsichtig im Reagenzglas gemischt, nach 5 Minuten wird ein Tropfen des gefärbten Ejakulats auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckglas bedeckt. Das Präparat kann dann anschließend untersucht werden.
Färbelösung:	Es wird eine Mischung aus Gentianaviolett und Safranin in alkoholischen Lösungen im Verhältnis 13:7 hergestellt. Diese Lösungen enthalten:

1 g Gentianaviolett, Merck, in 110 ml destilliertem Wasser und 110 ml 96% Alkohol, bzw.
2 g Safranin G extra, Ciba, in 145 ml destilliertem Wasser und 155 ml 96% Alkohol.

Testsimplet

Färbevorschrift:

In die Mitte eines industriell vorgefertigten farbstoffbeschichteten Objektträgers wird ein Tropfen verflüssigtes Ejakulat gegeben, mit einem Deckglas bedeckt und, falls notwendig, durch leichtes Andrücken des Deckglases Luftblasen herausgedrückt, bzw. das Sperma gleichmäßig verteilt. Nach einer Wartezeit von mindestens 5 Minuten kann das Präparat untersucht werden.

Erforderliches Material:

Testsimplet - Warenzeichen der Fa. Boehringer/Mannheim.

2.2. Ausstrichspräparate

Sternheimer-Malbin Färbung

Färbevorschrift:

Luftgetrocknete Ausstrichspräparate des verflüssigten Spermas werden 10 Minuten in Methylalkohol fixiert. Die fixierten Präparate werden dann 10 Minuten lang in Sternheimer-Malbin Lösung gefärbt.
Überschüssiger Farbstoff wird 3 mal für 5 Sekunden mit Propanol abgespült.

Anschließend werden die Ausstriche 5 Minuten in Xylol getaucht und mit Kanadabalsam und Deckglas versehen.

Erforderliche Lösungen: Methylalkohol
Sternheimer-Malbin Lösung (s. 2.1.)
Propanol, Xylol, Kanadabalsam

Dauer der Färbeprozedur: ca. 30 Minuten

Färbung nach Papanicolaou

Färbevorschrift: Luftgetrocknete Ausstriche des verflüssigten Ejakulats werden in einem Gemisch von 96% Alkohol und Äther (1:1) 5 Minuten fixiert, dann jeweils 10 Sekunden über eine absteigende Alkoholreihe (80%, 70%, 50%) in destilliertes Wasser verbracht, in Hämatoxylinlösung für 3 Minuten getaucht und unter fließendem Wasser abgespült. Nach 2 Sekunden Tauchen in 0.5% HCl und 5 Minuten Spülung unter fließendem Wasser werden die Präparate für je 10 Sekunden in eine aufsteigende Alkoholreihe (50%, 70%, 80%) verbracht, anschließend in Orange-G-Lösung 2 Minuten gefärbt und in 96% Alkohol 2 mal für 5 Sekunden abgespült. Dann werden die Ausstriche in Polychrom-Lösung 2 Minuten gefärbt und der überschüssige Farbstoff mit 96% Alkohol in 3 verschiedenen Gefäßen jeweils für 5 Sekunden abgespült. Anschließend werden die Präparate noch 2 Minuten in absoluten Alkohol,

	2 Minuten in ein Gemisch (1:1) aus absolutem Alkohol und Xylol und 5 Minuten in Xylol getaucht und dann mit Kanadabalsam und Deckglas versehen.
Erforderliche Lösungen:	Hämatoxylin Lösung nach Haaris Orange-G Lösung ea 65 Polychrom Lösung ea 65 Diäthyläther DAB 6 Äthanol 96%, 80%, 70%, 50% Äthanol absol. DAB 6 HCl 0.5% Xylol,Kanadabalsam
Dauer der Färbeprozedur:	ca. 45 Minuten.

3. Technik der morphologischen Differenzierung

Alle Präparate wurden in derselben Art und Weise bei 1000-facher Vergrößerung mit Ölimmersion mäanderförmig durchgemustert, wobei ein Bereich guter Beurteilbarkeit auf dem Objektträger gewählt wurde.

Die morphologische Beurteilung wurde entsprechend dem üblichen Standard (Schirren - 1982) vorgenommen: je Präparat wurden 200 Spermatozoen nach pathologischen Veränderungen beurteilt. Diese wurden noch in Veränderungen des Kopfes, des Mittelteils und des Schwanzes, sowie nach Protoplasmaanhängen differenziert. Zusätzlich wurden Spermatogenesezellen und Zellen des weißen Blutbildes, falls vorhanden, bewertet.

Typische Veränderungen sind in Abbildung 1 dargestellt (Joel - 1953; Schirren - 1982; WHO - 1980).

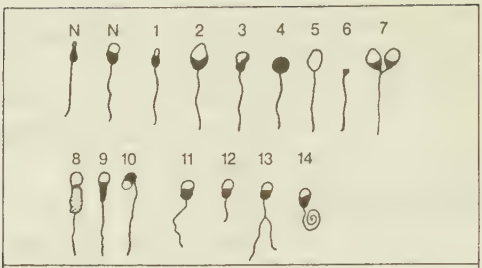


Abb. 1
Normale und pathologische Spermienformen, N = normal, 1) – 7) = Pathologische Köpfe: 1) Schmalkopf, 2) Riesenkopf 3) deformierter Kopf 4) Rundkopf 5) kein Chromatin 6) aplastischer Kopf 7) Doppelkopf 8) – 10) = pathologische Mittelteile: 8) Protoplasmaanhang 9) vedicktes Mittelteil 10) geknicktes Mittelteil 11) – 14) = pathologische Schwänze: 11) geknickter Schwanz 12) rudimentärer Schwanz 13) Doppelschwanz 14) aufgerollter Schwanz

Das normale reife Spermium ist durch reguläre ovale Kopfform und nicht aufgequollenen gestreckten Schwanz gekennzeichnet und liegt mit seinen Abmessungen im folgenden Größenbereich:

Kopflänge	4-5 µm
Kopfbreite	2.5-3.5 µm
Schwanzlänge	› 50 µm

Bei der routinemäßigen Differenzierung wurden die Spermien nur in Zweifelsfällen einzeln vermessen.
Für die quantitative vergleichende Analyse wurden die prozentualen Anteile der pathologisch geformten Spermien, der Kopfveränderungen sowie der Schwanzdeformitäten herangezogen, während die restlichen Merkmale wegen zu kleiner Häufigkeiten nur qualitativ bewertet wurden.
Außerdem wurden Fotografien einiger Präparate durch das Lichtmikroskop bei 1000-facher Vergrößerung für die jeweiligen Färbemethoden angefertigt.

4. Durchführung der Versuche

4.1. Vorversuche

24 Ausstrichspräparate wurden aus 12 Ejakulaten von 6 Probanden auf je 2 Objektträgern angefertigt und nach derselben Standardmethode (Papanicolaou) gefärbt.

a) Um die Inhomogenität des Ausstriches zu untersuchen, wurden 12 Objektträger in je drei Felder unterteilt (siehe Abbildung 2a) und in jedem dieser Felder 200 Spermien durch mäanderartiges Durchmustern untersucht.

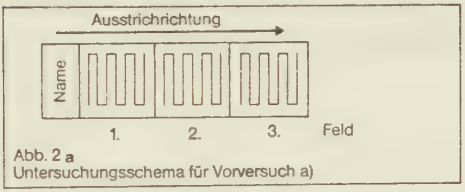


Abb. 2 a
Untersuchungsschema für Vorversuch a)

Um den Einfluß dieser Inhomogenität auf die Ergebnisse der üblichen Analysemethode, die im Aufsuchen einer subjektiv gut beurteilbaren Stelle auf dem Objektträger besteht, zu untersuchen, wurden die Ergebnisse letzterer Methode dann mit den zusammengefaßten Ergebnissen der systematischen Untersuchung in den drei Feldern verglichen.

b) Um die Inhomogenität zwischen zwei Ausstrichen des gleichen Ejakulats zu untersuchen, wurden von den 12 vorliegenden Ejakulaten je zwei Ausstrichspräparate angefertigt. Bei diesen wurden dann in üblicher Weise je 200 Spermien differenziert und die Ergebnisse miteinander verglichen.

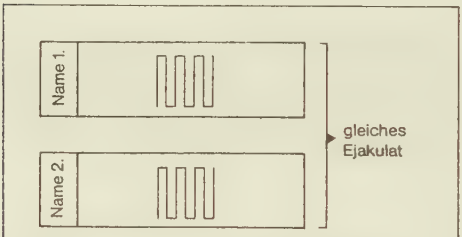


Abb. **2b**
Untersuchungsschema für Vorversuch b)

4.2. Hauptversuch

Dem Hauptversuch liegen 60 Ejakulate zugrunde, die von 6 Probanden an 10 verschiedenen Terminen - im wöchentlichen Abstand - gespendet wurden.
Von jedem Ejakulat wurden 2 Nativ- und 2 Ausstrichspräparate angefertigt und wie folgt angefärbt,

Nativpräparate:	Testsimplet
	Sternheimer-Malbin Färbung
Ausstrichspräparate:	Papanicolaou Färbung
	Sternheimer-Malbin Färbung

so daß insgesamt 240 verschiedene Präparate zur Analyse vorlagen. Zur Überprüfung der Haltbarkeit, Reproduzierbarkeit und Variabilität wurde jedes Präparat 4 mal zu unterschiedlichen Zeitpunkten differenziert.

Nativpräparate:	1. Differenzierung nach 2 Stunden
	2. Differenzierung nach 4 Stunden
	3. Differenzierung nach 6 Stunden
	4. Differenzierung nach 24 Stunden
Ausstrichspräparate:	1. Differenzierung am Tag der Färbung
	2. Differenzierung 1 Woche danach
	3. Differenzierung 2 Wochen danach
	4. Differenzierung 3 Wochen danach

An Hand der gefundenen Häufigkeiten pathologischer Formen wurden die Färbungen für

die Nativpräparate gegeneinander und
die Ausstrichspräparate gegeneinander

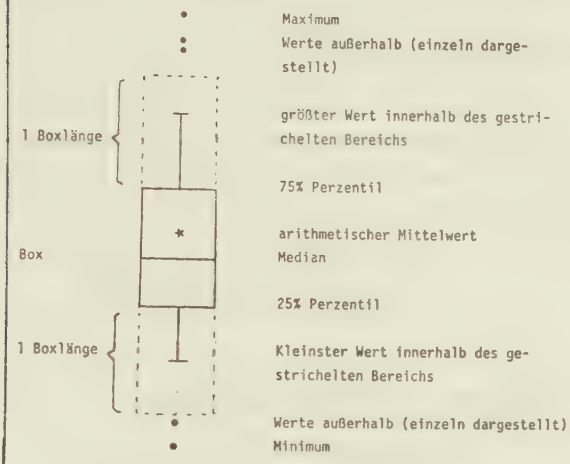
geprüft.
Zur Beurteilung der Haltbarkeit und Reproduzierbarkeit wurden für jede Färbung die Ergebnisse der verschiedenen Differenzierungszeitpunkte miteinander verglichen.

Weiterhin wurde mit Hilfe der Ergebnisse der wiederholten Differenzierungen der Färbeeinfluß in Relation zur methodeninhärenten Variabilität gestellt.
Schließlich wurde der Einfluß der Fixierung durch Vergleich der Ergebnisse der Nativ- gegen die Ausstrichspräparate geprüft.
Neben den oben genannten quantitativen Vergleichen wurde eine qualitative Beschreibung vorgenommen und eine fotografische Dokumentation des Färbeverhaltens erstellt.

5. Statistische Verfahren

Da erfahrungsgemäß die Annahme einer Normalverteilung bei den hier untersuchten Merkmalen und den entsprechenden Kollektivgrößen nicht gerechtfertigt ist (Schmassmann et al. - 1982), wurden für die statistischen Kenngrößen und Tests verteilungsfreie Verfahren verwendet, die auf Rangordnung der Daten basieren (Sachs - 1974).
So wurden zur Beschreibung der Häufigkeitsverteilungen Mediane, 25% und 75% Perzentile, Minima und Maxima sowie zusätzlich arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.
Entsprechend erfolgte die graphische Darstellung der Verteilungen der Merkmale mit Hilfe von sogenannten Box-plots, die für nicht normalverteilte Variablen eine besonders geeignete graphische Darstellungsform sind. Aus ihnen sind folgende Informationen über die Verteilung der zu untersuchenden Variablen ablesbar (Abbildung 3):
Median, arithmetisches Mittel, 25% und 75% Perzentile, Minimum, Maximum und "Ausreißer".

Abb. 3 : Box-Plots



Häufigkeitsunterschiede wurden unter Benutzung paarweiser Wilcoxon Tests (Wilcoxon - 1963; McCornack - 1965) und Friedman Tests (Friedman - 1937) auf statistische Signifikanz geprüft.
Für den direkten graphischen Vergleich der Ergebnisse der Färbemethoden wurden zweidimensionale Scatterdiagramme angefertigt. Es handelt sich dabei um Punktwolken, die die verbundene Struktur des Versuchsplanes berücksichtigen, indem sie das an einem Ejakulat mittels zwei Färbungen gewonnene Datenpaar als einen Punkt in der Ebene darstellen.
Als Maß für die lineare Abhängigkeit der Ergebnisse der Färbeverfahren sowie als Maß für die Reproduzierbarkeit wurden Korrelationskoeffizienten berechnet.

III. Ergebnisse

1. Vorversuche

1.1. Ergebnisse der Vorversuche

a) Für die Analyse der intraindividuellen Homogenität der Ausstriche werden in Tabelle 2 die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der Differenzen der Ergebnisse zwischen den einzelnen Feldern auf den Objektträgern dargestellt. Zusätzlich wird die größte vorgefundene Differenz (Max) angegeben.

Tab.:2
Häufigkeitsdifferenzen der pathologischen Formen zwischen verschiedenen Feldern auf den Objektträgern (n. s. = nicht signifikant)

	Differenzen (%)				
Felder	MW	SD	Max		
1vs.2	1.58	8.22	15	n.s.	path. Spermien
1vs.3	4.75	14.03	42	n.s.	
2vs.3	2.83	19.23	57	n.s.	
1vs.2	1.79	8.04	12.5	n.s.	path. Köpfe
1vs.3	0.63	9.88	19	n.s.	
2vs.3	3.71	7.09	15.5	n.s.	
1vs.2	0.54	3.99	6.5	n.s.	path. Schwänze
1vs.3	2.46	3.04	8	n.s.	
2vs.3	3.25	4.90	14.5	n.s.	

Wie aus der Tabelle ersichtlich, muß zum Beispiel beim Anteil der pathologischen Spermien mit einer mittleren Differenz von 4.75% (Feld 1 vs. Feld 3) gerechnet werden, wobei auf einem speziellen Objektträger die Differenz zwischen den Ergebnissen in Feld 2 und Feld 3 sogar 57% beträgt. Die dargestellten Unterschiede wurden durch den Friedman Test für verbundene Stichproben als nicht signifikant ($p > 0.05$) ausgewiesen.

Faßt man die Ergebnisse der einzelnen Felder zu Gruppen zusammen, so läßt sich die unterschiedliche Verteilung der Ergebnisse aus folgender Tabelle 3, beziehungsweise aus der graphischen Darstellung mittels Box-plots (Abbildung 4) ablesen.
Es ist auf die erhöhte Anzahl pathologischer Schwänze in Feld 3 hinzuweisen, in dem sich viele abgetrennte Schwänze befanden.

Tab.:3
Häufigkeiten der pathologischen Formen in den verschiedenen Feldern auf den Objektträgern

Feld	MW	SD	Min	Med	Max	(%)
1	51.83	11.39	30	54	68	path. Spermien
2	53.42	14.42	28	75.5	73	path. Spermien
3	56.25	19.58	23	54.5	98	path. Spermien
1	46.71	12.44	24.5	51	64.5	path. Köpfe
2	48.59	12.39	21	52.5	70.5	path. Köpfe
3	46.00	15.92	14.5	45.5	72.5	path. Köpfe
1	15.88	7.10	3.5	15.5	28.5	path. Schwänze
2	15.09	6.42	8	12.5	30	path. Schwänze
3	18.34	8.29	7.5	16	36.5	path. Schwänze

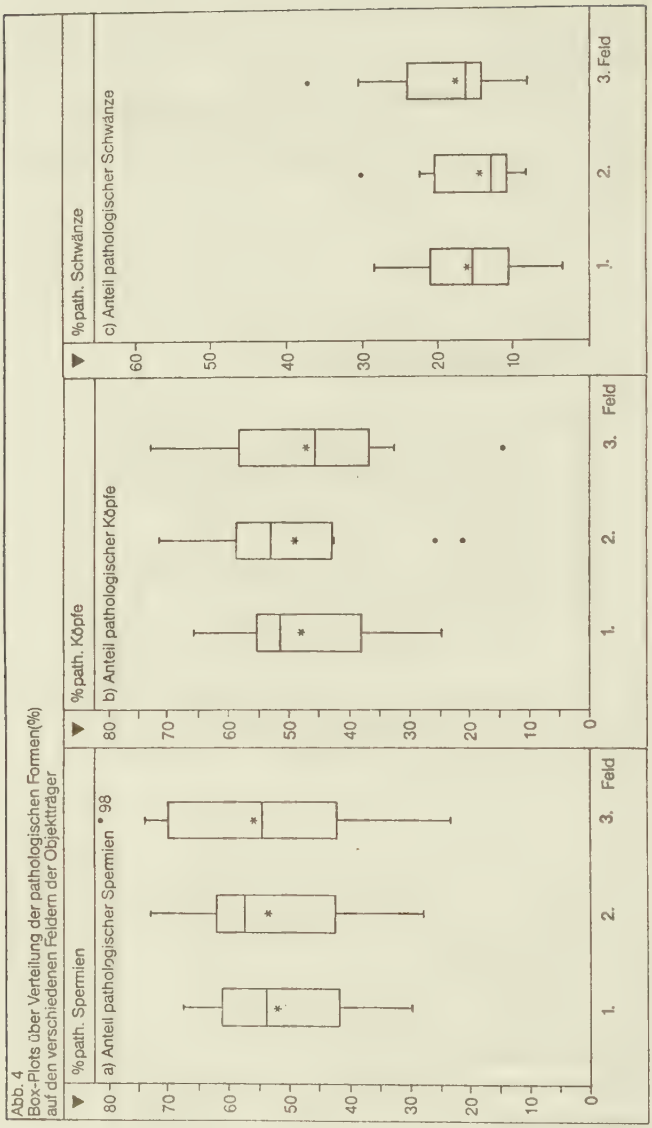


Abb. 4
Box-Plots über Verteilung der pathologischen Formen(%) auf den verschiedenen Feldern der Objektträger

Im Vergleich der klassischen Beurteilungsmethode, nämlich durch Aufsuchen einer subjektiv gut beurteilbaren Stelle auf dem Objektträger, mit der systematischen Auszählung an den 3 verschiedenen Stellen ergeben sich wiederum mittlere Differenzen bis zu 3.15% für den Anteil pathologischer Köpfe, die auch statistisch signifikant sind ($p<0.05$ Wilcoxon Test), wobei die maximale Differenz im Einzelfall 21% beträgt (siehe Tabelle 4).

Tab.:4
Häufigkeitsdifferenzen der pathologischen Formen innerhalb des gleichen Ejakulats bei Auswertung aller drei Felder gegen Auswertung an subjektiv gut beurteilbarer Stelle (übliches Verfahren)

	Differenzen (%)			
	MW	SD	Max	
pathol. Spermien	3.06	6.17	21	n.s
pathol. Köpfe	3.15	3.84	11	$p<0.05$
pathol. Schwänze	1.70	3.44	6.6	n.s.

b) Beim Vergleich der Ergebnisse auf 2 verschiedenen Objektträgern mit Ausstrichen desselben Ejakulats ergeben sich mittlere Differenzen bis zu 3% für den Anteil pathologischer Köpfe und eine maximale Differenz von 10% für den Anteil pathologischer Spermien im Einzelfall (Tabelle 5).
Für den Anteil pathologischer Spermien sowie pathologischer Köpfe erwiesen sich die Unterschiede sogar als statistisch signifikant ($p<0.05$ Wilcoxon Test).

Tab.: 5
Häufigkeitsdifferenzen der pathologischen Formen innerhalb des gleichen Ejakulats auf zwei verschiedenen Objektträgern

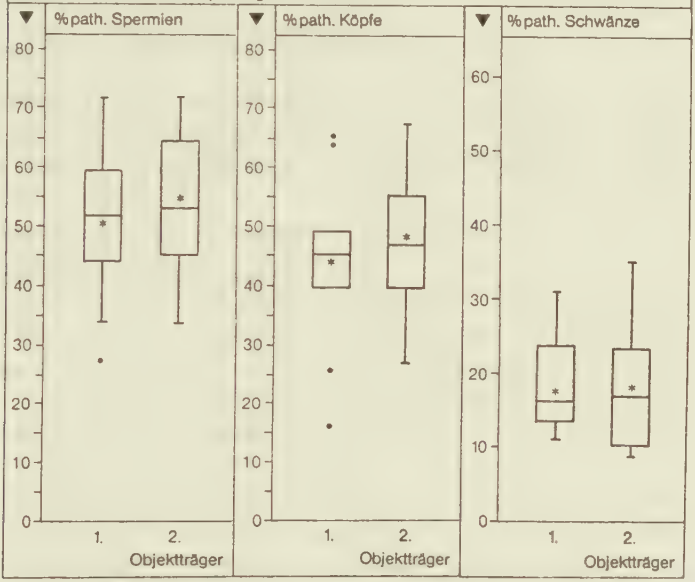
	Differenzen (%)			
	MW	SD	Max	
pathol. Spermien	2.75	4.00	10	$p < 0.05$
pathol. Köpfe	3.00	4.17	9.5	$p < 0.05$
pathol. Schwänze	0.46	4.02	7	n.s.

Die Unterschiedlichkeit der Befunde der gleichen Kollektive auf den zwei Objektträgergruppen wird zusätzlich durch die gruppenweise Zusammenfassung der Ergebnisse in Tabelle 6 und die graphische Darstellung (Abbildung 5) verdeutlicht.

Tab.: 6
Häufigkeiten der pathologischen Formen innerhalb des gleichen Ejakulats auf 2 verschiedenen Objektträgern

Objekt-träger	MW	SD	Min	Med	Max	%
1	50.83	13.20	24	52	72	path. Spermien
2	53.58	12.17	34	53	72	
1	44.17	13.58	16.5	45.5	65	path. Köpfe
2	47.59	14.02	27	47	67	
1	18.13	6.19	10.5	16	31	path. Schwänze
2	17.66	8.20	8	16.5	35	

Abb. 5
Box-Plots über Verteilung der pathologischen Formen (%)
auf den verschiedenen Objektträgern



1.2. Konsequenzen der Vorversuche

Es ist eine mittlere methodeninhärente Unschärfe von <5% anzusetzen. Für den statistischen Vergleich von Färbemethoden, beziehungsweise Behandlungen etc., ist der biologisch relevante Unterschied >5% festzulegen. Dementsprechend sind Stichprobenumfänge für statistische Tests zu planen und statistisch signifikante Unterschiede zu interpretieren. Die Interpretationsmöglichkeit statistisch signifikanter Tests ist durch das Ergebnis von Vorversuch b), bei dem es schon beim gleichen Ejakulat zu signifikanten Unterschieden kam, eingeschränkt (siehe auch IV.2.).

So wird im folgenden das Schwergewicht mehr auf deskriptive als auf induktive Verfahren der Statistik gelegt,und Unterschiede zwischen den Färbemethoden werden jeweils in Relation zur Variabilität innerhalb der Färbegruppen interpretiert.

2. Hauptversuch

2.1. Vergleich der Nativpräparate

2.1.1. Qualitative Beschreibung

Beide Färbeprozeduren nehmen höchstens 6 Minuten in Anspruch. Schon nach ungefähr 4 Minuten sind dann die Spermien unbeweglich. Die Präparate sind dann ab diesem Zeitpunkt differenzierbar.
Beide Färbemethoden geben den angefärbten Strukturen einen violetten Farbton.
Die Akrosomen sind jeweils gut erkennbar, da sie im Gegensatz zum restlichen Spermienkopf kaum angefärbt werden. Mittelteile kommen bei der Sternheimer-Malbin Färbung deutlicher zur Darstellung, da diese durch die Testsimplets nur sehr schwach angefärbt werden. Spermatozyten werden bei beiden Färbemethoden mit dunkelvioletten Kernen und deutlich blasserem Zytoplasma dargestellt. Die Differenzierung von Spermatiden und Leukozyten ist mit beiden Methoden möglich, da Leukozytengranula im Zytoplasma zum Teil deutlich violett zur Darstellung kommen, beziehungsweise Kernfilamente, die die Kernsegmente der Leukozyten verbinden, erkennbar sind. Lymphozyten sind durch ihren exzentrisch liegenden Kern, der jeweils dunkel violett gefärbt ist, und durch ihre Größe gekennzeichnet.
Folgende Fotografien lichtmikroskopischer Bilder von Nativpräparaten (Abbildung 6) geben Beispiele der verschiedenen Färbemethoden.

Abbildung 6: Nativpräparate, normale und pathologische Spermien,sowie Zellen der Spermiogenese

a) Testsimplet

b)Sternheimer-Malbin Färbung

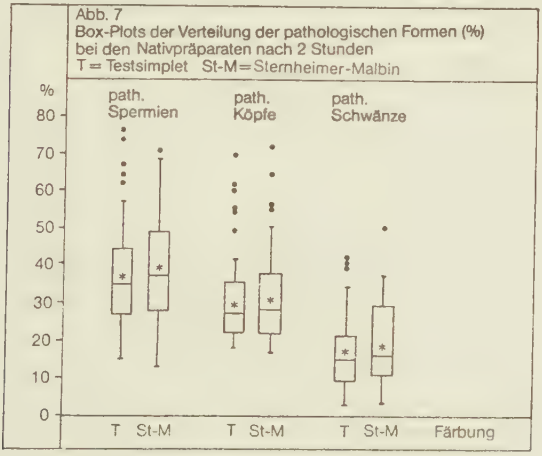
2.1.2. Häufigkeiten pathologischer Formen

Eine Übersicht über die Ergebnisse der morphologischen Differenzierung nach 2 Stunden sind pro Färbekollektiv in der folgenden Tabelle 7 mittels Darstellung der Mittelwerte, Mediane sowie Standardabweichungen der Mittelwerte gegeben.

Tab.:7
Häufigkeiten der pathologischen Formen auf Nativpräparaten bei Färbung mit Testsimplet und nach Sternheimer-Malbin

MW±SEM (%)	path. Spermien	path. Köpfe	path Schwänze
Testsimplet	37.37±1.79	30.25±1.55	16.27±1.23
Sternheimer-M.	39.49±1.94	31.43±1.73	18.72±1.42
Median (%)			
Testsimplet	35.0	27.0	15.0
Sternheimer-M.	37.0	28.0	16.0

Zusätzliche Informationen über die Verteilung der Ergebnisse in den Färbegruppen bietet die graphische Darstellung mittels Boxplots (Abbildung 7).



Diese gruppenweise Darstellung der Ergebnisse berücksichtigt nicht den "verbundenen" Versuchsplan, d.h. die Färbungen wurden an den gleichen Ejakulaten durchgeführt. Diese zusätzliche Information wird erst durch paarweise Darstellungsformen, wie zum Beispiel mit Hilfe von Scatterdiagrammen (Punktwolken) genutzt. Jedem Punkt entspricht ein verbundenes Datenpaar, das das Ergebnis der Differenzierung desselben Ejakulats unter den beiden Färbungen angibt (Abbildung 8). Für den Fall, daß mehrere Datenpaare denselben Wert haben, wird dies in folgender Weise dargestellt:

▪ = 2 Datenpaare

▲ = 3 Datenpaare

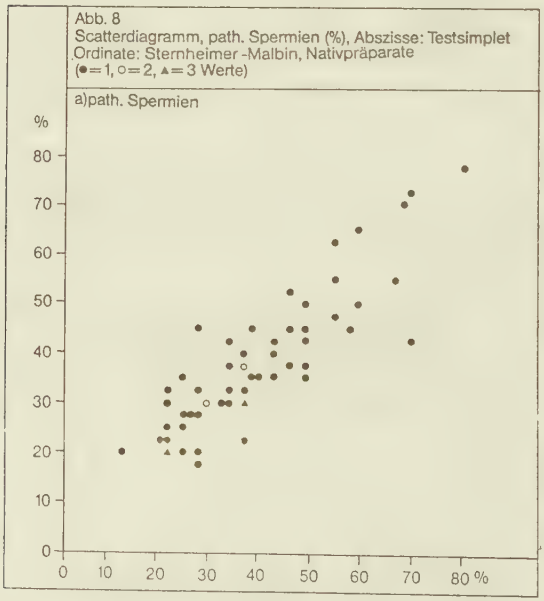


Abb. 8
Scatterdiagramm, path. Spermien (%), Abszisse: Testsimplet
Ordinate: Sternheimer-Malbin, Nativpräparate
(●=1, ○=2, ▲=3 Werte)

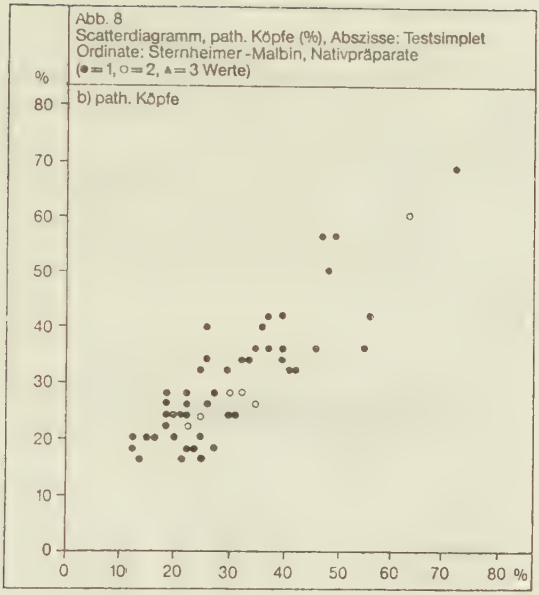


Abb. 8
Scatterdiagramm, path. Köpfe (%), Abszisse: Testsimplet
Ordinate: Sternheimer-Malbin, Nativpräparate
(●=1, ○=2, ▲=3 Werte)
%
b) path. Köpfe
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80 %

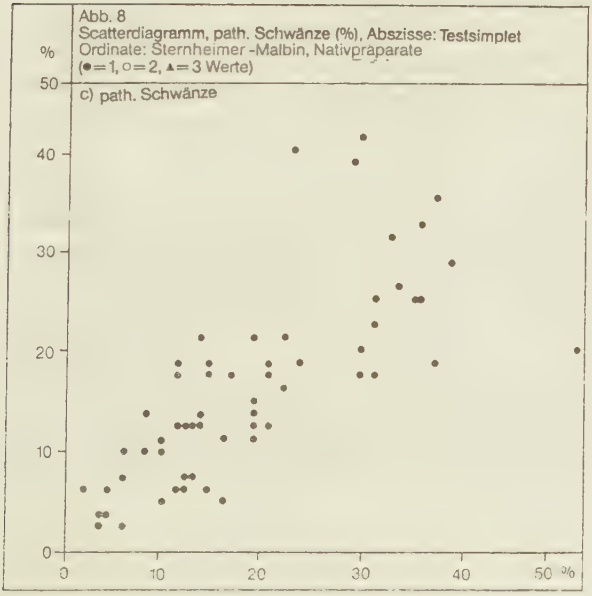


Abb. 8
Scatterdiagramm, path. Schwänze (%), Abszisse: Testsimplet
Ordinate: Sternheimer-Malbin, Nativpräparate
(●=1, ○=2, ▲=3 Werte)
%
c) path. Schwänze
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50 %

Die Unterschiede der Ergebnisse der morphologischen Differenzierungen zwischen den beiden Färbegruppen wurden mittels des paarweisen Wilcoxon Tests statistisch geprüft und für den Anteil pathologischer Schwänze für statistisch signifikant ($p<0.01$) befunden.
Ein Maß für die lineare Abhängigkeit der Ergebnisse der beiden Färbemethoden bietet der Korrelationskoeffizient. Dieser ist in Tabelle 8 angegeben.

Tab.:8
Korrelationskoeffizienten für Häufigkeiten der pathologischen Formen, Testsimplet vs. Sternheimer-Malbin Färbung

Differenzierungs-merkmal	Korrelations-koeffizient
path. Spermien	$r = 0.87$
path. Köpfe	$r = 0.88$
path. Schwänze	$r = 0.74$

2.1.3. Einfluß des Differenzierungszeitpunktes

Sämtliche Präparate wurden wiederholt 2, 4, 6 und 24 Stunden nach Anfärbung morphologisch differenziert. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 9 - 11 dargestellt, sowie der Zeiteinfluß mittels Boxplots veranschaulicht (Abbildungen 9 - 11).
Nach 24 Stunden waren nur noch 49 der 60 Testsimplets beurteilbar, (81.67%), dagegen 55 von 60 der mit der Sternheimer-Malbin Färbung behandelten, (91.67%). Bei den nicht beurteilbaren Präparaten wurden vermehrt aufgequollene Zellen sowie Luftblasen beobachtet.
Besonders bei den Testsimplets fällt ein Abwärtstrend des Anteils pathologischer Spermien beziehungsweise pathologischer Köpfe auf (Tabellen und Abbildungen 9 und 10), wohingegen der Anteil pathologischer Schwänze in beiden Färbegruppen annähernd konstant ist (Tabelle 11, Abbildung 11).

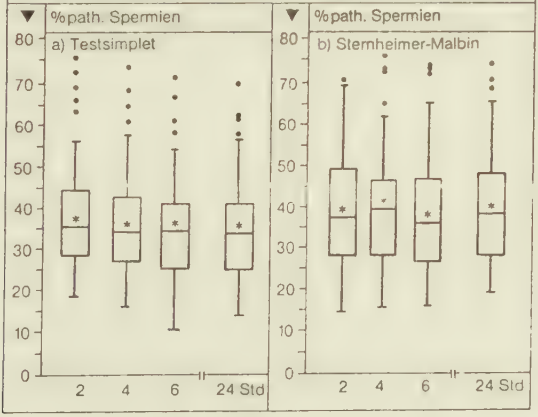
Tab.: 9 a
Einfluß des Differenzierungszeitpunktes auf den Anteil path. Spermien, Testsimplet

	n	MW ± SEM	Min	Med	Max
2 Stunden	60	37.37 ± 1.79	18.0	35.0	77.0
4 Stunden	60	35.75 ± 1.66	15.0	33.0	74.0
6 Stunden	60	33.88 ± 1.72	9.0	33.0	71.0
24 Stunden	49	33.78 ± 1.89	12.0	32.0	69.0

Tab.: 9 b
Einfluß des Differenzierungszeitpunktes auf den Anteil path. Spermien, Sternheimer-Malbin Färbung

	n	MW ± SEM	Min	Med	Max
2 Stunden	60	39.49 ± 1.94	14.0	37.0	81.0
4 Stunden	60	39.41 ± 1.95	15.0	39.0	77.0
6 Stunden	60	37.58 ± 1.89	15.0	35.0	74.0
24 Stunden	55	37.67 ± 1.93	18.0	37.0	74.0

Abb. 9
Box-Plots über Einfluß des Differenzierungszeitpunktes auf den Anteil pathologischer Spermien (%)



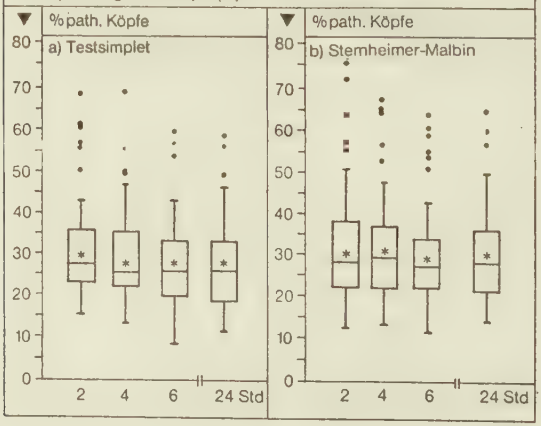
Tab.:10a
Einfluß des Differenzierungszeitpunktes auf den Anteil path. Köpfe, Testsimplet

	n	MW±SEM	Min	Med	Max
2 Stunden	60	30.25±1.55	15.0	27.0	68.0
4 Stunden	60	27.95±1.46	12.5	24.5	68.5
6 Stunden	60	26.09±1.45	7.0	24.5	58.5
24 Stunden	49	25.59±1.59	10.0	24.0	57.5

Tab.:10b
Einfluß des Differenzierungszeitpunktes auf den Anteil path. Köpfe, Sternheimer-Malbin Färbung

	n	MW±SEM	Min	Med	Max
2 Stunden	60	31.43±1.73	12.5	28.0	72.5
4 Stunden	60	31.27±1.63	13.0	29.0	67.5
6 Stunden	60	29.11±1.52	11.0	26.5	63.0
24 Stunden	55	29.12±1.61	13.0	27.0	64.0

Abb. 10
Box-Plots über Einfluß des Differenzierungszeitpunktes auf den Anteil pathologischer Köpfe (%)



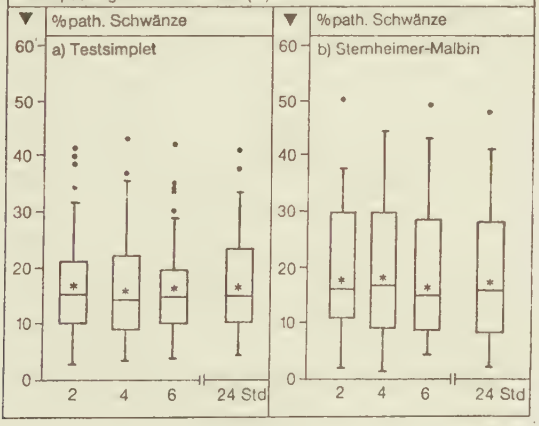
Tab.:11a
Einfluß des Differenzierungszeitpunktes auf den Anteil path. Schwänze, Testsimplet

	n	MW±SEM	Min	Med	Max
2 Stunden	60	16.27±1.23	2.0	15.0	41.5
4 Stunden	60	15.54±1.26	2.5	13.5	43.5
6 Stunden	60	15.22±1.18	2.5	14.0	42.0
24 Stunden	49	16.01±1.33	3.0	14.0	40.5

Tab.:11b
Einfluß des Differenzierungszeitpunktes auf den Anteil path. Schwänze, Sternheimer-Malbin Färbung

	n	MW±SEM	Min	Med	Max
2 Stunden	60	18.72±1.42	2.0	16.0	50.0
4 Stunden	60	18.66±1.56	1.0	16.5	44.5
6 Stunden	60	18.09±1.50	4.0	14.5	49.0
24 Stunden	55	18.14±1.57	1.5	15.5	47.5

Abb. 11
Box-Plots über Einluß des Differenzierungszeitpunktes auf den Anteil pathlogischer Schwänze (%)



Als Maß für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei den einzelnen Färbemethoden wird der Korrelationskoeffizient für die Ergebnisse der Differenzierung nach 2 und 4 Stunden berechnet (Tabelle 12).

Tab.:12
Korrelationskoeffizienten für Häufigkeiten der pathologischen Formen, Differenzierung nach 2 Stunden vs. Differenzierung nach 4 Stunden

Differenzierungs-merkmal	Korrelationskoeffizienten Testsimplet	Sternheimer-M.
path. Spermien	r = 0.91	r = 0.92
path. Köpfe	r = 0.86	r = 0.91
path. Schwänze	r = 0.87	r = 0.91

Es fallen die insgesamt mit um 0.9 hohen, bei der Sternheimer-Malbin Färbung etwas höheren Werte der Korrelationskoeffizienten auf, die unter der Annahme einer Konstanz der Präparate in den ersten 4 Stunden für eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sprechen.

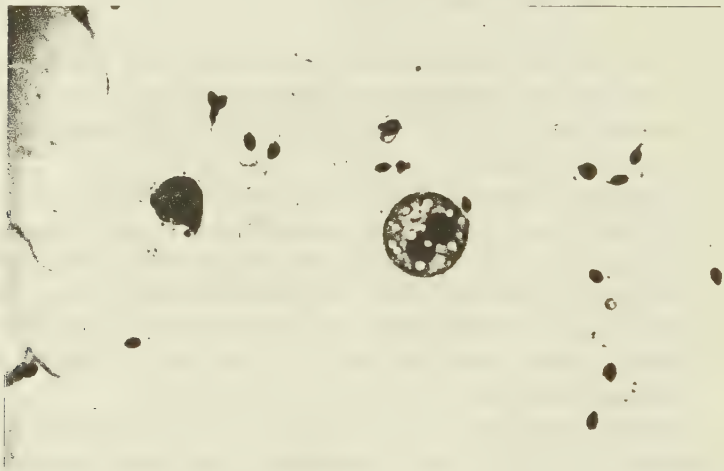
2.2. Vergleich der Ausstrichspräparate

2.2.1. Qualitative Beschreibung

Für mit Methanol fixierte Ausstrichspräparate zeigt die Sternheimer-Malbin Färbung das wie für die Nativpräparate beschriebene Färbeverhalten (siehe 2.1.1.). Im Vergleich zu letzteren wirken die Ausstrichspräparate geringfügig farbintensiver.
Im subjektiven Vergleich zur Färbung nach Papanicolaou, bei der sich bekannterweise die Zellkerne vom Zytoplasma durch Gegenfärbung deutlich abheben, erscheint die Sternheimer-Malbin Färbung ebenbürtig. Sie bietet zwar nicht diesen zweifarbigen Kontrast, läßt aber die entsprechenden Strukturen ebenso erkennen. Lediglich die Spermienschwänze werden bei der Färbung nach Papanicolaou etwas kräftiger dargestellt.
Zur Durchführung der letzteren benötigt man jedoch mindestens 45 Minuten, wobei, falls kein Färbeautomat zu Verfügung steht, das dauernde Eingreifen des Personals erforderlich ist.Die Sternheimer-Malbin Färbung ist nach ca. 30 Minuten durchgeführt, wobei nur wenige Arbeitsschritte nötig sind (siehe II.2.2.2.).
Beispiele für das jeweilige Färbeverhalten geben folgende Fotografien (Abbildung 12).

Abbildung 12: Fixierte Ausstrichspräparate, normale und pathologische Spermien,sowie Zellen der Spermiogenese

a) Papanicolaou Färbung



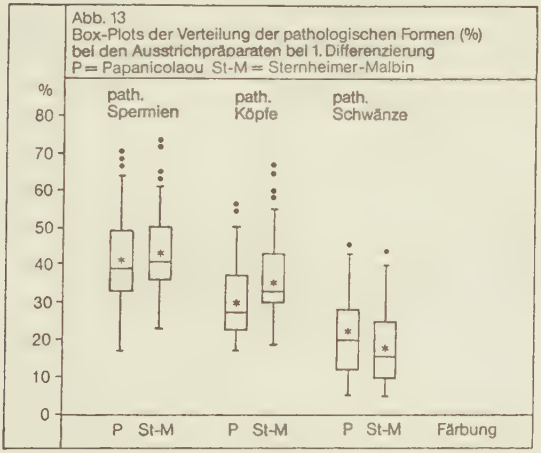
b) Sternheimer-Malbin Färbung

2.2.2. Häufigkeiten pathologischer Formen

Ergebnisse der morphologischen Differenzierung für die beiden Färbungen Papanicolaou und Sternheimer-Malbin für luftgetrocknete Ausstrichspräparate sind in Tabelle 13 und Abbildung 13 gruppenweise nebeneinander gestellt.

Tab.:13
Häufigkeiten der pathologischen Formen bei Ausstrichspräparaten, Färbung nach Papanicolaou und nach Sternheimer-Malbin

MW ± SEM (%)	path. Spermien	path. Köpfe	path Schwänze
Papanicolaou	41.25 ± 1.64	30.49 ± 1.42	20.45 ± 1.31
Sternheimer-M.	43.15 ± 1.69	35.75 ± 1.46	17.82 ± 1.27
Median (%)			
Papanicolaou	39.0	27.0	20.0
Sternheimer-M.	41.0	33.0	15.5



Die hier gefundenen Unterschiede für die Anteile pathologischer Köpfe und Schwänze sind statistisch zwar signifikant ($p<0.01$), lassen sich jedoch bei der 2., 3. und 4. Differenzierung nicht reproduzieren, worauf weiter unten im Abschnitt 2.2.3. ausführlich eingegangen wird.
Die folgenden Scatterdiagramme (Abbildungen 14a,b,c) stellen die Ergebnisse beider Färbungen bei der ersten Differenzierung im paarweisen Vergleich dar.

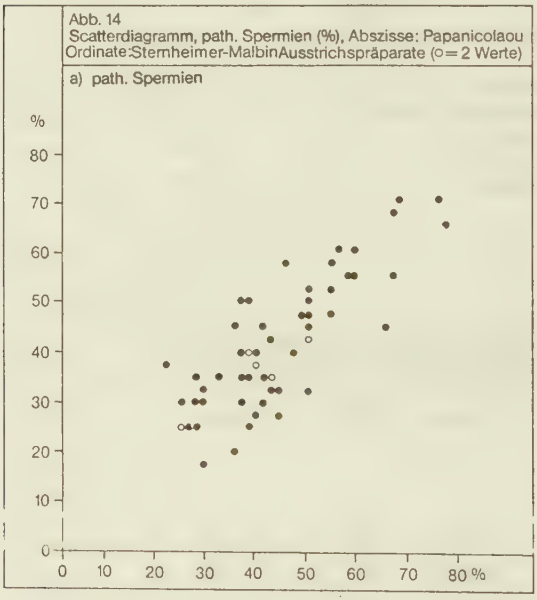


Abb. 14
Scatterdiagramm, path. Spermien (%), Abszisse: Papanicolaou
Ordinate: Sternheimer-Malbin Ausstrichspräparate (○ = 2 Werte)

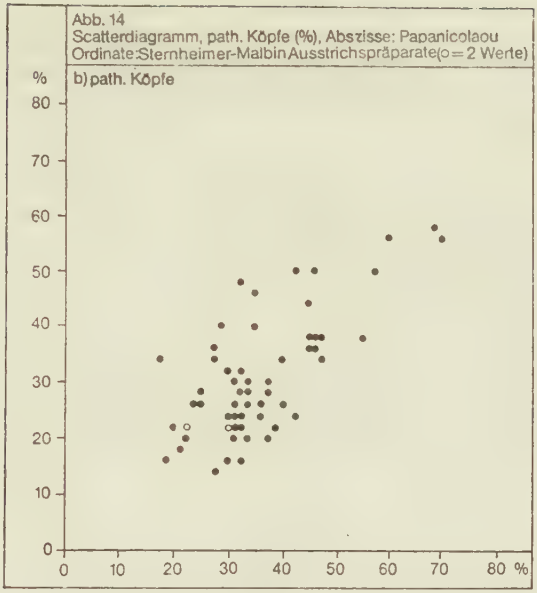


Abb. 14
Scatterdiagramm, path. Köpfe (%), Abszisse: Papanicolaou
Ordinate: Sternheimer-Malbin Ausstrichspräparate (o = 2 Werte)
b) path. Köpfe
%
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 %

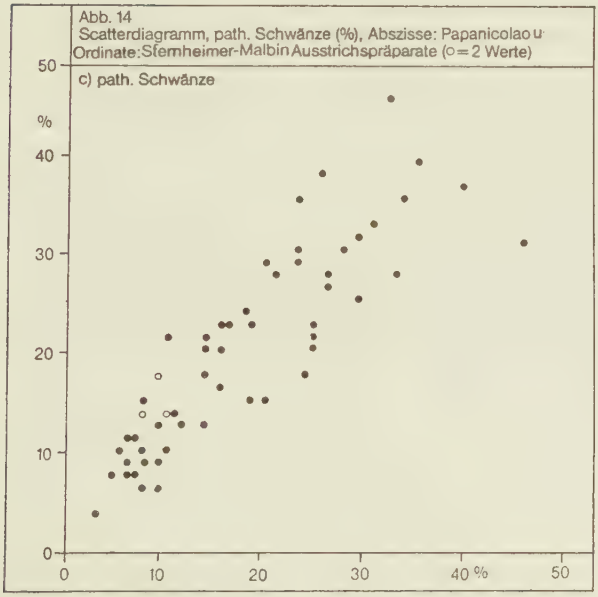


Abb. 14
Scatterdiagramm, path. Schwänze (%), Abszisse: Papanicolaou
Ordinate: Sternheimer-Malbin Ausstrichspräparate (o = 2 Werte)
c) path. Schwänze
50
%
40
30
20
10
0
0 10 20 30 40 % 50

Als Maß für die lineare Abhängigkeit der Ergebnisse der beiden Färbemethoden sind in der folgenden Tabelle 14 die Korrelationskoeffizienten angegeben.

Tab.:14
Korrelationskoeffizienten für Häufigkeit der pathologischen Formen, Papanicolaou und Sternheimer-Malbin Färbung

Differenzierungs-merkmal	Korrelations-koeffizient
path. Spermien	r = 0.83
path. Köpfe	r = 0.72
path. Schwänze	r = 0.87

2.2.3. Reproduzierbarkeit, Variabilität und Haltbarkeit

Die Ergebnisse der in wöchentlichem Abstand 4 mal durchgeführten Differenzierungen der gleichen Präparate werden in den Tabellen 15 - 17 und in den Abbildungen 15 - 17 für die Papanicolaou und die Sternheimer-Malbin Färbung parallel dargestellt. An Hand der Box-plots (Abbildungen 15 - 17) ist schon im Überblick zu erkennen, daß die Unterschiede der Häufigkeiten der pathologischen Formen zwischen den verschiedenen Färbungen die Unterschiede innerhalb einer Färbegruppe bei wiederholter Differenzierung nicht übertreffen.

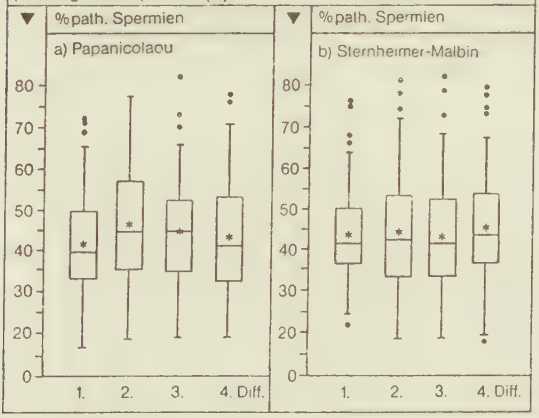
Tab.:15a
Anteil pathologischer Spermien (%) bei wiederholter Differenzierung, Papanicolaou Färbung

	n	MW ± SEM	Min	Med	Max
1. Diff.	60	41.25 ± 1.64	17.0	39.0	71.0
2. Diff.	60	45.56 ± 1.85	19.0	44.0	77.0
3. Diff.	60	43.92 ± 1.86	19.0	44.0	81.0
4. Diff.	60	42.53 ± 1.81	19.0	40.0	77.0

Tab.:15b
Anteil pathologischer Spermien (%) bei wiederholter Differenzierung, Sternheimer-Malbin Färbung

	n	MW ± SEM	Min	Med	Max
1. Diff.	60	43.15 ± 1.69	21.0	41.0	76.0
2. Diff.	60	43.69 ± 1.90	18.0	42.0	81.0
3. Diff.	60	43.37 ± 1.86	18.0	41.0	82.0
4. Diff.	60	44.83 ± 1.89	17.0	43.0	79.0

Abb. 15
Box-Plots über Einfluß wiederholter Differenzierung auf Anteil pathologischer Spermien (%)



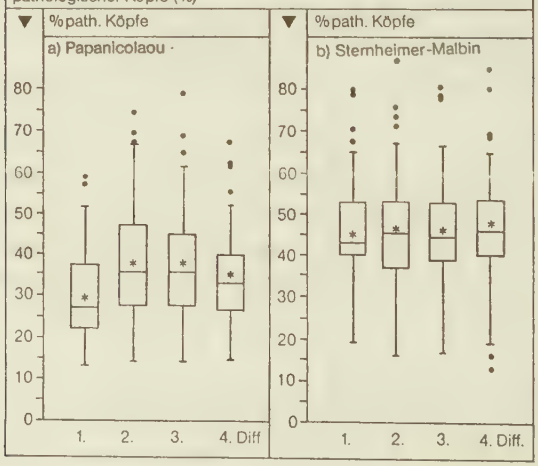
Tab.: 16a
Anteil pathologischer Köpfe (%) bei wiederholter Differenzierung, Papanicolaou Färbung

	n	MW±SEM	Min	Med	Max
1. Diff.	60	30.49±1.42	14.0	27.0	57.0
2. Diff.	60	37.57±1.77	15.0	35.0	72.5
3. Diff.	60	36.27±1.76	14.5	35.0	76.0
4. Diff.	60	34.03±1.53	15.0	32.0	64.0

Tab.: 16b
Anteil pathologischer Köpfe (%) bei wiederholter Differenzierung, Sternheimer-Malbin Färbung

	n	MW±SEM	Min	Med	Max
1. Diff.	60	35.75±1.46	18.0	33.0	70.0
2. Diff.	60	36.08±1.60	15.5	35.0	77.0
3. Diff.	60	35.95±1.60	16.0	34.0	70.0
4. Diff.	60	37.81±1.71	12.0	35.5	74.5

Abb. 16
Box-Plots über Einluß wiederholter Differenzierung auf Anteil pathologischer Köpfe (%)



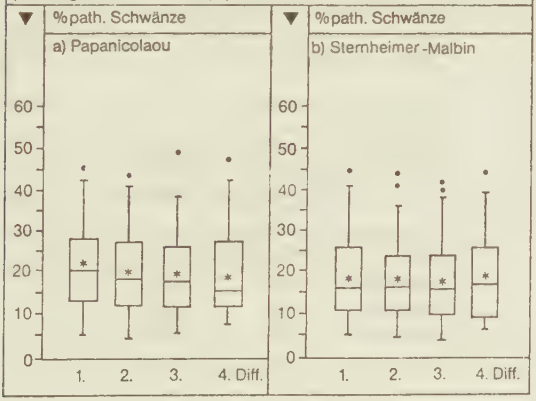
Tab.: 17 a
Anteil pathologischer Schwänze (%) bei wiederholter Differenzierung, Papanicolaou Färbung

	n	MW ± SEM	Min	Med	Max
1. Diff.	60	20.45 ± 1.31	4.0	20.0	45.5
2. Diff.	60	19.73 ± 1.34	3.0	18.0	43.5
3. Diff.	60	18.31 ± 1.30	3.5	17.0	49.0
4. Diff.	60	18.31 ± 1.35	6.0	15.0	47.0

Tab.: 17 b
Anteil pathologischer Schwänze (%) bei wiederholter Differenzierung, Sternheimer-Malbin Färbung

	n	MW ± SEM	Min	Med	Max
1. Diff.	60	17.82 ± 1.27	4.0	15.5	44.0
2. Diff.	60	17.74 ± 1.29	3.5	16.0	43.5
3. Diff.	60	17.14 ± 1.33	2.0	14.5	40.5
4. Diff.	60	17.78 ± 1.35	5.0	16.5	43.5

Abb. 17
Box-Plots über Einfluß wiederholter Differenzierung auf Anteil pathologischer Schwänze (%)



Wie aus Tabelle 16a und Abbildung 16a ersichtlich, ist das Ergebnis der 1. Differenzierung der nach Papanicolaou gefärbten Präparate als "Ausreißer" zu betrachten, da die Ergebnisse der drei weiteren Differenzierungen der gleichen Präparate ca. 5% höhere Anteile pathologischer Kopfformen ergeben. Diese unterscheiden sich dann nicht mehr von den Werten der Sternheimer-Malbin Färbung.

Vergleicht man die gemittelten Ergebnisse aller Differenzierungen, was einer Beurteilung von bis zu 800 Spermien pro Ejakulat entspricht, so liegen die Unterschiede zwischen den Färbekollektiven unter 2% (Tabelle 18).

Tab.:18
Gemittelte Ergebnisse der Häufigkeiten pathologischer Formen über allen Differenzierungen

(%)	Papanicolaou	Sternheimer-M.
path. Spermien	43.32	43.76
path. Köpfe	34.59	36.40
path. Schwänze	19.20	17.62

Zur Bewertung der Reproduzierbarkeit werden in der folgenden Tabelle 19 die Korrelationskoeffizienten für die 1. Differenzierung vs. die 2. Differenzierung für beide Färbungen angegeben.

Tab.:19
Korrelationskoeffizienten für Häufigkeit der pathologischen Formen, 1. Differenzierung und 2. Differenzierung

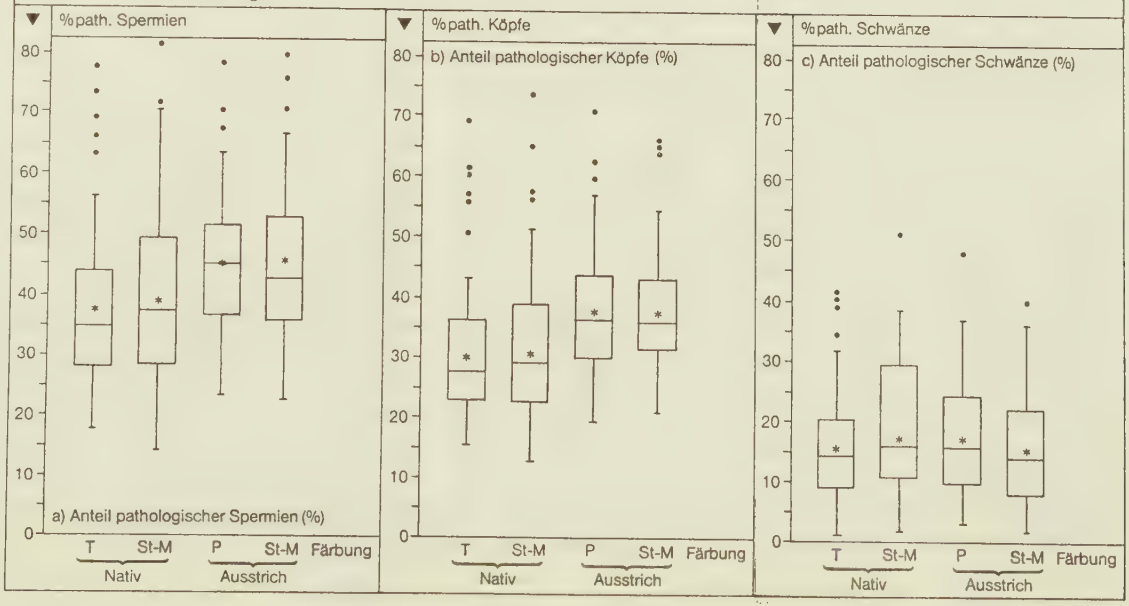
Differenzierungsmerkmal	Korrelationskoeffizienten Papanicolaou	Sternheimer-M.
path. Spermien	r = 0.81	r = 0.90
path. Köpfe	r = 0.72	r = 0.85
path. Schwänze	r = 0.91	r = 0.93

Auffallendster Befund ist die deutlich bessere Reproduzierbarkeit der Daten für pathologische Kopfformen bei der Sternheimer-Malbin Färbung, wobei zu bemerken ist, daß der kleinere Korrelationskoeffizient für die Papanicolaou Färbung zum gewissen Maß Ausdruck des stark abweichenden Ergebnisses der 1. Differenzierung dieser Färbung ist (siehe weiter oben).
Die Qualität der Präparate erschien bei beiden Färbungen über den Zeitraum von 4 Wochen als gleichbleibend gut.

2.3. Vergleich aller Präparate - Einfluß der Fixierung

Um die Häufigkeiten der pathologischen Formen bei den Nativpräparaten und den Ausstrichspräparaten besser miteinander vergleichen zu können, sind diese in der folgenden Abbildung 18 zusammenfassend dargestellt, wobei zu erwähnen ist, daß für die Ausstrichspräparate die repräsentativen Ergebnisse der 3.Differenzierung gewählt wurden, um den über alle Differenzierungen gemittelten Ergebnissen möglichst nahe zu kommen.
Auffallend ist der um ca. 4% höhere Anteil pathologischer Spermien bei den Ausstrichspräparaten (Abbildung 18a). Dieser ist auf den erhöhten Anteil pathologischer Köpfe zurückzuführen (Abbildung 18b), während der Anteil pathologischer Schwänze bei Nativ- und Ausstrichspräparaten als konstant zu betrachten ist (Abbildung 18c). Dies wird durch die teststatistische Analyse mittels Wilcoxon Tests bestätigt, bei denen die Unterschiede der Häufigkeiten für pathologische Spermien und Köpfe als signifikant ($p<0.01$) ausgewiesen wurden.

Abb. 18
Box-Plots über Verteilung pathologischer Formen (%)
bei Nativ- und Ausstrichsfärbungen



IV. Diskussion

1. Färbemethoden

Nachdem die fehlende Vergleichbarkeit spermatologischer Untersuchungen von Freund (1966) gezeigt worden war, (siehe auch IV.2.), brachte internationale Zusammenarbeit mit Unterstützung der WHO Standards für die Gewinnung, Untersuchung und Beurteilung von Ejakulaten hervor, wobei auch diverse Färbemethoden beschrieben und empfohlen wurden (Eliasson - 1971; WHO - 1980; Schirren - 1981).

Als häufig verwendete Routineverfahren für Ausstrichspräparate findet man heute in Kliniklaboratorien die Färbung nach Papanicolaou (Papanicolaou - 1942) und die Hämatoxylin Färbung, die auch als Mayer-Stiasny Färbung bezeichnet wird (Schirren - 1982). Diese Methoden werden auf Grund von Vergleichsstudien als gleichwertig beschrieben (Hellinga et al. - 1973), wohingegen Singer (1981) die Papanicolaou Färbung als zuverlässiger und geeigneter zum Differenzieren von Jungformen und pathologischen Veränderungen empfiehlt. Die Färbung nach Giemsa, die zuweilen zusätzlich zur besseren Darstellung von Mikroorganismen und Rundzellen verwendet wird, schneidet im Vergleich zu den oben genannten für die Beurteilung der Spermienmorphologie schlechter ab (Hellinga et al. - 1973).
Färbungen zur besseren Darstellung von Spermiophagen (Phadke - 1978), zur Anfärbung von Leukozytengranula (Nahoum und Cardozo - 1980), Fluoreszensverfahren (Tejada et al. - 1981) sowie Methoden zur simultanen Bestimmung der Vitalität und Morphologie (Emilson et al. - 1978; Makler - 1979; Tyler und Crockett - 1982) sollten diesen Spezialfragestellungen vorbehalten bleiben. Sie erscheinen ebenso wie mikrokomputergestützte Bildanalyseverfahren (Schmassmann et al. - 1982) für den Routinebetrieb noch nicht geeignet zu sein.

Um das Problem der Rundzellendifferenzierung und der Spermien-

untersuchung mit einer einzigen Färbung gut bewältigen zu können, wurde ein kombiniertes Färbeverhalten aus Bryans Färbung für Spermien und Leishmans Blutfärbung entwickelt (Couture et al. - 1976). Dieses Verfahren, das gute Ergebnisse bringt (Calamera und Vilar - 1979), wird ebenso wie die Färbung nach Papanicolaou von der WHO empfohlen (WHO - 1980). Da jene Färbung jedoch sehr schwierig und aufwendig ist, konnte sie sich selbst in Speziallabors in Deutschland nicht durchsetzen.
Für den alltäglichen Routineeinsatz in Arztpraxen und kleinen Labors wurden in den letzten Jahren industriell vorgefertigte Schnelltests für Nativpräparate, wie die vorgefertigten Testsimplets von Boehringer und die Färbefolien Sangodiff von Merck, entwickelt. Es handelt sich dabei um für Blutausstriche entwikkelte Verfahren, deren Einsatzbereich auf Spermiogramme erweitert wurde. Diverse Vergleichsstudien zeigen, daß die Testsimplets hinsichtlich der Beurteilbarkeit der Spermienmorphologie zu den oben genannten Standardverfahren gleichwertige Ergebnisse liefern (Schirren et al. - 1977; Calamera und Vilar - 1979; Schoenfeld et al. - 1981). Als Hauptnachteil wird die fehlende Haltbarkeit der Testsimplets beschrieben. In einer weiteren Untersuchung wurde die Sangodiff Färbung mit den Testsimplets verglichen, wobei bei zum Teil unterschiedlichen Ergebnissen für die einzelnen pathologischen Formen sich die Testsimplets als einfacher in der Handhabung und die Sangodiff Präparate als haltbarer erwiesen (Wernicke und Schirren - 1982).
In einer kurzen Mitteilung beschreiben Alford und Rivard (1981) die Anwendung von Sedi-stain, einer kommerziell erhältlichen Färbung für Urinsedimente auf der Basis der Sternheimer-Malbin Färbung (Sternheimer-Malbin - 1952) zur routinemäßigen Untersuchung von Nativpräparaten als eine einfache, schnelle und zuverlässige Methode. Es existieren jedoch weder Berichte über ihre Verwendbarkeit für Ausstrichspräparate noch existieren systematische Vergleichsuntersuchungen mit Standardfärbemethoden. Somit ist der Wert der Sternheimer-Malbin Färbung für den Routinebetrieb bisher nicht ausreichend beurteilbar.

2. Vorversuche und Methodenkritik

In den Vorversuchen wird das schon von Freund (1966) aufgeworfene Problem der Inhomogenität des Materials und seiner Beurteilung untersucht. Dieser hatte eine große Variabilität bei der Beurteilung gleicher Fotografien angefärbter Ausstrichspräparate in 28 Laboratorien in 11 Ländern gefunden und als Voraussetzung für wissenschaftliches Arbeiten eine internationale Standardisierung der morphologischen Untersuchung sowie eine Analyse der intra- und interindividuellen Inhomogenität der Ejakulate und der Variabilität der Beurteilung gefordert.
In der Literatur wurde bisher hauptsächlich die intra- und interindividuelle Variabilität der Beurteilung untersucht. Eliasson (1971) berichtet, daß die Unterschiede der Beurteilung zwischen Untersuchern aus demselben Laboratorium mit einer mittleren Differenz von 8% für den Anteil pathologischer Spermien wesentlich geringer als Unterschiede zwischen verschiedenen Labors mit über 16% mittlerer Differenz ausfallen.
Hellinga et al. (1973) kommen aufgrund ähnlicher Untersuchungen zu dem Schluß, daß Ergebnisse verschiedener Untersucher nicht kombiniert werden dürften, und selbst die Ergebnisse des gleichen Beurteilers nur über beschränkte Zeiträume vergleichbar seien.
Die von mir in den Vorversuchen gefundene mittlere Variabilität von bis zu 5% für die Verteilung der pathologischen Formen innerhalb desselben Ejakulats ergänzt die oben genannten Ergebnisse auf der intraindividuellen Ebene.
Die gefundene unterschiedliche Verteilung der pathologischen Spermien auf den verschiedenen Lokalisationen des Objektträgers steht im Einklang mit Ergebnissen für Bullensperma (Harasymowysc et al.- 1976).
Als Konsequenz aus diesen in der Literatur beschriebenen und hier in den Vorversuchen gefundenen Ergebnissen ergibt sich folgende Forderung:
Bei der Planung und Interpretation von Experimenten, bei denen

Spermiogramme verglichen werden, ist zu berücksichtigen, daß Unterschiede, mögen sie auch statistisch signifikant seien, unterhalb von 5% keine biologische Relevanz besitzen.
Dies untermauert die bisher für die Praxis als ausreichend beschriebene Genauigkeit von 5% (Schirren et al.-1977).

Beschäftigt man sich mit der Auswertung gefärbter Präparate,so scheint es subjektiv leicht zu sein, die Qualität einer Färbemethode zu beurteilen, beziehungsweise verschiedenene Färbungen zu vergleichen.
Problematisch wird es, versucht man die Güte einer Färbung zu objektivieren und zu operationalisieren, das heißt, Messgrößen oder Zahlen zuzuordnen, die statistisch sinnvoll vergleichbar sind. Die Möglichkeit durch eine Pseudoobjektivität fehlgeleitet zu werden und Ergebnisse statistischer Signifikanztests fehl- oder überzuinterpretieren, ist gerade hier nicht gering, da zum einen dem Untersuchungsmaterial und der Methode eine große Variabilität zu eigen ist (s. IV.2.), zum anderen ein absoluter Maßstab fehlt.
Die übliche Methode, verschiedene Färbemethoden durch die statistische Analyse der jeweils gefundenen Häufigkeiten pathologischer Formen mittels Signifikanztests zu vergleichen, kann zu widersprüchlichen Interpretationen führen, wie an folgenden Beispiel erkennbar ist:

- einen signifikant höheren Anteil pathologischer Formen bei der Papanicolaou- gegenüber der H.-E. Färbung werten Singer et al. (1981) als höhere "Effizienz" der Färbung nach Papanicolaou;
- einen signifikant höheren Anteil pathologischer Köpfe bei der Giemsa- gegenüber der Papanicolaou-, bzw. der H.-E.Färbung werten Hellinga et al. (1973) als vermehrte Produktion von "Artefakten" durch die Giemsa Färbung;
- bei Wernicke und Schirren (1982) wird das Interpretationsproblem angedeutet, und es wird dem Leser überlassen, ob er den signifikant höheren Anteil pathologischer Mittelteile bei der

Sangodiff Färbung gegenüber den Testsimplets als vermehrte Artefaktproduktion oder aber als besseres Anfärbeverhalten der Färbung mit Sangodiff interpretiert.

Diese dargestellten Probleme scheinen nicht zu bestehen, wenn keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. Dann schliesen die oben zitierten Autoren einheitlich auf die Gleichwertigkeit der Färbemethoden.Dies ist jedoch mit den oben genannten Beispielen nicht zu vereinbaren, da sich zum Beispiel Artefaktproduktion und besseres Färbeverhalten überlagern und so die Ergebnisse verwischen können.
Dieses hier angesprochene Problem bleibt auch weiterhin bestehen, da die tatsächliche Anzahl pathologischer Spermien eines angefärbten Präparates unbekannt bleibt. Die oben erwähnten Lösungsvorschläge sind unbefriedigend. Es scheint mir daher empfehlenswert, sich nicht mit dem Vergleich der Häufigkeiten pathologischer Formen in den jeweiligen Färbekollektiven zu begnügen, sondern auch mittels Korrelationen, Punktwolken und paarweiser Tests die durch die verbundene Struktur des Versuchsplans vorgegebene Information weitgehend auszuschöpfen, und auch durch Analyse der methodeninhärenten Variabilität und Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit die Interpretationskraft der Ergebnisse zu erhöhen.

3. Hauptversuch

Die Nativpräparate wurden entsprechend der Arbeitsanleitung (Schirren - 1977) erstmals nach 2 Stunden differenziert. Ergebnisse von Schoenfeld et al. (1981), wonach Spermiogramme mit Testsimplets sogar schon nach 4 Minuten beurteilbar sind, lassen sich bei stichprobenhafter Überprüfung sowohl für die Testsimplets als auch für die Sternheimer-Malbin Färbung bestätigen.
Im subjektiven Eindruck erscheinen die einzelnen Strukturen, insbesondere Mittelteile, bei der Sternheimer-Malbin Färbung etwas kräftiger als bei den Testsimplets dargestellt.
Ohne spezielle Versiegelung der Deckgläser, beziehungsweise nachträglicher Fixierung (Schoenfeld et al. - 1981), bestätigt sich die eingeschränkte Haltbarkeit der Nativpräparate, wie sie auch von Wernicke und Schirren (1982) beschrieben werden. Nach 24 Stunden sind nur noch 49 der 60 Testsimplets und 55 der 60 Sternheimer-Malbin Präparate differenzierbar, wobei die Zahl der aufgequollenen Köpfe zunimmt.
Die Ergebnisse nach 6 Stunden, verglichen mit denen nach 2 und 4 Stunden, lassen den Schluß zu, daß bei Raumtemperatur die Nativpräparate mindestens 6 Stunden differenzierbar sind. Für Testsimplets wird die Haltbarkeit mit 4 - 6 Stunden angegeben (Wernicke und Schirren - 1982).
Beim quantitativen Vergleich zwischen den Färbungen liegen die Differenzen der Häufigkeiten der pathologischen Formen mit weniger als 2.5% weit unter der durch die Variabilität definierten relevanten Grenze von 5%. Entsprechende Ergebnisse berichten Schoenfeld et al. (1981) für den Vergleich der Testsimplets mit der H.-E. Färbung. Es ist anzumerken, daß sich im paarweisen Vergleich ein statistisch signifikanter Unterschied für die Anzahl pathologischer Schwänze ergibt. Jedoch liegt der Korrelationskoeffizient mit einem Wert von 0.72 für die Schwänze noch über sämtlichen von Wernicke und Schirren (1982) berichteten Werten für den Vergleich von Testsimplets und Sango-

diff Färbung.
Die Reproduzierbarkeit, gemessen an den Korrelationskoeffizienten zwischen den Differenzierungen nach 2 und 4 Stunden, ist für beide Nativfärbungen mit Werten um 0.9 sehr gut, wobei sich für die Sternheimer-Malbin Färbung etwas bessere Werte ergeben.
Bei den Ausstrichspräparaten erscheint im subjektiven Eindruck die Sternheimer-Malbin Färbung der Färbung nach Papanicolaou gleichwertig, wobei die Schwänze bei letzterer etwas deutlicher wirken. Für die Differenzierung von Rundzellen und Jungformen ergeben sich keine qualitativen Unterschiede.
Der Zeitaufwand ist mit der sehr großen Zahl der Arbeitsgänge bei der Färbung nach Papanicolaou wesentlich größer als bei der Sternheimer-Malbin Färbung, bei der die Objektträger nur einmal in Färbelösung getaucht werden müssen.
Beim quantitativen Vergleich dieser beiden Färbemethoden zeigt sich, daß die Unterschiede der Häufigkeiten mit weniger als 2% vernachlässigbar klein sind. Der für die erste Differenzierung gefundene Unterschied für die Häufigkeit der pathologischen Kopfformen erweist sich bei vergleichender Analyse der vierfachen Differenzierung als Variation innerhalb der nach Papanicolaou gefärbten Präparate. Entsprechend schneidet die Sternheimer-Malbin Färbung beim Vergleich der Reproduzierbarkeit mit Werten der Korrelationskoeffizienten um 0.9 besser ab.
Die Haltbarkeit der Präparate ist über den Analysezeitraum von 4 Wochen gleichbleibend gut. Stichprobenhafte Analysen nach 12 Monaten zeigen weiterhin eine gute Qualität der Präparate in beiden Färbekollektiven.
Beim Vergleich der Nativ- mit den fixierten Ausstrichspräparaten bestätigt sich mit einem um 4% höheren Anteil pathologischer Kopfformen bei letzteren die schon von Hellinga et al. (1973) untersuchte vermehrte Artefaktbildung durch Fixierung der Präparate. Harasymowysz et al. (1976) bestätigen dies durch Untersuchungen an Bullensperma. Der um 4% höhere Anteil pathologischer Kopfformen bei den fixierten Präparaten liegt

zwar unterhalb der oben erwähnten 5% Schwelle der Variabilität, läßt sich jedoch einheitlich über alle Differenzierungen reproduzieren und ist somit als relevant anzusehen. Auch Wernicke und Schirren (1982) betonen, daß jede Art der Fixierung zu vermehrter Artefaktbildung führe. Entsprechend der Empfehlung von Hellinga et al. (1973) wird Methanol als Fixierungsmittel für die Sternheimer-Malbin Färbung gewählt.
Im Vergleich mit je einem guten Vertreter für Schnellfärbungen von Nativpräparaten und Dauerfärbungen von luftgetrockneten, fixierten Ausstrichspräparaten zeigt sich, daß die Sternheimer-Malbin Färbung gleichwertige Ergebnisse liefert und die Anforderungen (Tabelle 1, I.1.) gut erfüllt: zum einen ist gute Erkennbarkeit der einzelnen Strukturen der Spermien, gute Differenzierbarkeit von Rundzellen und gute Reproduzierbarkeit gewährleistet; zum anderen ist diese Methode unkompliziert, schnell und einfach in jeder Praxis durchzuführen. Der Untersucher braucht sich lediglich mit einer einzigen Färbung vertraut zu machen und kann entscheiden, ob er Nativpräparate im Schnellverfahren oder archivierbare fixierte Ausstrichspräparate anfertigen und differenzieren will.

V. Zusammenfassung

Anhand von 264 Nativ- und Ausstrichspräparaten wird die Eignung der Sternheimer-Malbin Färbung für die morphologische Differenzierung menschlicher Spermien im Routinebetrieb untersucht.
Dabei wird die Sternheimer-Malbin Färbung im direkten Vergleich zu häufig verwendeten Standardverfahren - den industriell vorgefertigten Testsimplets für Nativpräparate und der Färbung nach Papanicolaou für fixierte Ausstrichspräparate - geprüft.
Sowohl im qualitativen Vergleich als auch bei der quantitativen Analyse der jeweils gefundenen Häufigkeiten pathologischer Formen zeigt sich, daß die Sternheimer-Malbin Färbung für die Anfärbung von Nativ- und Ausstrichspräparaten gleichwertige Ergebnisse zu den Standardfärbungen liefert. Die gefundenen Unterschiede liegen unterhalb der in Vorversuchen bestimmten methodeninhärenten Variabilität.
Mit der Sternheimer-Malbin Färbung steht somit eine zuverlässige und unkomplizierte Färbemethode zur Verfügung, die wahlweise als Schnellmethode für Nativpräparate oder als wenig aufwendige Färbung für archivierbare fixierte Ausstrichspräparate für den Routinebetrieb zu empfehlen ist.

VI. Literatur

Alford, L. and D. Rivard. 1981. A simple stain for differentiating semen constituents. J. Urol. 126, 609-610.

Calamera, J.C. and O. Vilar. 1979. Comparative study of sperm morphology with three different staining procedures. Andrology 11, 255.

Couture, M., M. Ulstein and C.A. Paulsen. 1976. Improved staining method of differentiating immature germ cells from white blood cells in human seminal fluid. Andrologia 8, 61-66.

Eliasson, R. 1971. Standards for investigation of human semen. Andrologie 3, 49-64.

Eliasson, R. 1971. Interlaboratory coordination and control in andrology. Andrologie 3, 113-115.

Emilson, L.B.V., K.A. Dougherty, A.T.K. Cockett and R.L. Urry. 1978. Simultaneous determination of human sperm morphology and viability. J. Urol. 11, 488-491.

Fredricsson, B. 1978. On the development of different morphologic abnormalities in human spermatozoa. Andrologia 10, 43-48.

Fredricsson, B. 1979. Morphologic evaluation of spermatozoa in different laboratories. Andrologia 11, 57-61.

Freund, M. 1966. Standards for the rating of human sperm morphology. Int. J. Fertil. 11, 197.

Friedman, M. 1937. The use of ranks to avoid the assumption of normality implicit in the analysis of variance. J. Amer. Statist. Assoc. 32, 675-701.

Harasymowysz, J., L. Ball and G.E. Seidel. 1976. Evaluation of bovine spermatozoal morphologic features after staining and fixation. Amer. J. Vet. Res. 37, 1053-1057.

Hartman, C.G., C. Schoenfeld and E. Copeland. 1964. Individualism in the semen picture of infertile man. Fert. Steril. 3, 231-250.

Hefter, H., Hrsg: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, XXXV/2: Androgene II und Antiandrogene. Berlin-Heidelberg-New York, Springer, 1974.

Hellinga, G.: Clinical Andrology. London, Heinemann, 1976:24.

Hellinga, G., R. Ruward and V.M. Oppers. 1973. The influence of fixation of spermatozoa. Fertility and sterility Proc. VII World Congress Japan, 233-235. Amsterdam: excerpta medica.

Jachczik, R. 1978. Vergleichende Untersuchung der morphologischen Differenzierung menschlicher Spermatozoen mittels eines vorgefertigten Objektträgers und der Papanicolaou Färbung. Hamburg: Dissertation.

Joel, C.A.: Studien am menschlichen Sperma. Basel, Schwalbe, 1953.

MacLeod, J. 1964. Human seminal cytology as a sensitive indicator of the germinal epithelium. Int. J. Fertil. 9, 281-295.

MacLeod, J. 1967. The clinical implication of deviations in human spermatogenesis as evidenced in seminal cytology and the experimental production of these deviations. Fertility and sterility Proc. V World Congress Stockholm, 563-574. Amsterdam: Excerpta medica.

MacLeod, J. and R.Z. Gold. 1951. The male factor in fertility and infertility. Sperm counts in 1000 men of known fertility and 1000 cases of infertility marriage. J. Urol. 66, 436-449.

Makler, A. 1979. Simultaneous differentiation between motile, nonmotile, live and dead human spermatozoa combining supravital staining and multiple exposure photography procedures. Int. J. Androl. 2, 32-42.

McCornack, R.C. 1965. Extended tables of the Wilcoxon matched pair signed rank statistic. J. Amer. Statist. Assoc. 60, 864-871.

Moench, G.L. 1931. Sperm morphology in relation to fertility. Amer. J. Obstet. Gynecol. 22, 199.

Nahoum, C. and D. Cardozo. 1980. Staining for volumetric count of leukocytes in semen and prostate-vesicular fluid. Fert. Ster. 34, No.1, 68-69.

Papanicolaou, G.N. 1942. A new procedure for staining vaginal smears. Science 95, 438-439.

Phadke, A.M. 1978. Neutral red supravital staining for cellular elements in the semen. Andrologia 10, 80-84.

Riedel, H.H. 1977. Die Differenzierung der "Rundzelle" im menschlichen Ejakulat. Hamburg: Dissertation.

Sachs, L.: Angewandte Statistik. Berlin-Heidelberg-New York, Springer, 1974.

Schirren, C.: Praktische Andrologie. Basel, S. Karger, 1982.

Schirren, C. 1983. Warum morphologische Differenzierung der Spermatozoen? Andrologia 15 (1), 97-98.

Schirren, C., U. Eckhardt, J. Jachczik and C.A. Carstensen. 1977. Morphological differentiation of human spermatozoa with Test-simplet-slides. Andrologia 9, 191-192.

Schmassmann, A., G. Mikuz, G. Bartsch and H. Rohr. 1982. Objective and reproducible methods for evaluation sperm morphology. Eur. Urol. 8, 274-279.

Schoenfeld, C., R.D. Amelar, L. Dubin and S. Amelar. 1981. A new staining technique for the rapid determination of the morphologic characteristics of sperm. Fert. Ster. 36, 408-410.

Singer, R., M. Sagiv, M. Barnet, D. Allouf, B. Landau, E. Segenreich and C. Servadio. 1981. Head abnormalities: assessment of sperm in the routine laboratory. Andrologia 13, 236-241.

Sternheimer, R. and B. Malbin. 1951. Clinical recognition of pyelonephritis with a new stain for urinary sediments. Amer. J. Med. 11, 312.

Tejada, R.I., J.J. Marck, J.H. Winer and S. Friedman. 1981. A new metachromatic fluorescent stain for rapid morphologic evaluation of human sperm. Fert. Ster. 36, 535-537.

Tyler, I.P.P. and N.G. Crockett. 1982. Comparison of the morphology of vital and dead human spermatozoa. J. Reprod. Fert. 66, 667-670.

Wernicke, J. und C. Schirren. 1982. Morphologische Differenzierung menschlicher Spermatozoen mittels vorgefertigter Methodik. Vergleichende Untersuchung. Andrologia 14, 548-550.

WHO: Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Press. Concern Singapore,1980.

Wilcoxon, F. 1963. Critical values and probability levels for the Wilcoxon rank sum test and the Wilcoxon signed rank test. Lederle laboratories, Pearl River, N.Y.

Zanefeld, L.J.D. and K.L. Polaski. 1977. Collection and physical examination of the ejakulate. In Techniques of human andrology, North Holland, Biomedical Press, 147-171.

An dieser Stelle danke ich

Herrn Prof.Dr.med.G.Laudahn für die freundliche Überlassung des Themas,

Herrn Dr.med.H.Wendt für die intensive Betreuung und Förderung,

Frau I.Heinze für die umfangreiche Unterstützung bei den labortechnischen Arbeiten,

Frau S.Singer für die Programmierung der statistischen Analysen,

meiner Freundin Ulla Menne für die große Geduld beim Tippen der vielfachen Korrekturen

und nicht zuletzt den Probanden für die gute Zusammenarbeit.

Lebenslauf

Am 2.2.1952 wurde ich, Constantin Ammann,als Sohn des Arztes Dr.med.Günter Ammann und seiner Ehefrau, der Ärztin Dr.med. Ingeborg Ammann, geb. Mahnke, in Berlin geboren.In Berlin besuchte ich ab 1958 die Grundschule. Die Gymnasialzeit verbrachte ich in der Internatsschule Stiftung Louisenlund, an der ich auch 197o die Reifeprüfung ablegte.

Anschließend begann ich 1970 an der Freien Universität Berlin Physik , Mathematik und Operations Research zu studieren.Während des Studiums arbeitete ich 3 Jahre als Tutor für die Betreuung von Arbeitsgruppen in mathematischer Statistik. 1977 beendete ich dieses Studium mit der Anfertigung einer Diplomarbeit über optimale Versuchsplanung und dem Ablegen der Prüfung zum Diplom-Mathematiker.

1977 immatrikulierte ich mich dann für Humanmedizin an der Freien Universität Berlin.

Von 1980-1982 war ich dann bei der Schering AG als Biometriker mit der Planung und Auswertung von klinischen Studien, sowie mit der Analyse epidemiologischer Studien beschäftigt.

1982 legte ich dann nach einer 4 monatigen Auslandsfamulatur in Australien das zweite Staatsexamen ab und nach dem praktischen Jahr, das ich an Berliner Kliniken absolvierte, erhielt ich im Juni 1984 nach Ablegen des letzten Teils der ärztlichen Prüfung die Approbation für Humanmedizin.

Seit dem bin ich ab Juni 1984 in der kardiologischen Abteilung des Klinikum Steglitz mit der Betreuung einer internationalen Therapiestudie ,I.S.A.M. (intravenöse Streptokinase bei akutem Myokardinfarkt) tätig.

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☎ 3416451
Dissertationen